

Морфологические характеристики секреторных нейронов ядер гипоталамуса при воздействии темновой депривации у самок крыс

Лариса Игоревна Кондакова

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Аннотация. В эксперименте на беспородных крысах-самках 4-месячного возраста исследовано влияние 30-суточной темновой депривации (свето-темновой режим 24/0 ч, искусственное освещение 300 Лк) на супрахиазматическое (СХЯ) и аркуатное (АЯ) ядра гипоталамуса. Исследование показало, что при постоянном искусственном освещении в течение 30 сут. уменьшаются морфометрические параметры СХЯ гипоталамуса: площадь и объем перикариона СХЯ на 8,6 % ($p < 0,001$) и 4,6 % ($p < 0,001$); площадь и объем ядра на 7,6 % ($p < 0,05$) и 11,6 %. Выявлено уменьшение размеров АЯ: площадь и объем перикариона на 41,3 % ($p < 0,001$) и 56,8 % ($p < 0,001$); площадь и объем ядра на 42,7 % ($p < 0,001$) и 54,4 % ($p < 0,001$). Морфометрические характеристики СХЯ и АЯ практически полностью восстанавливались до значений контрольной группы в течение 14 дней после отмены темновой депривации, что отражает процессы обратимого повреждения нейронов за счет реализации компенсаторно-приспособительных механизмов.

Ключевые слова: преждевременное старение, темновая депривация, гипоталамус, супрахиазматическое ядро, аркуатное ядро

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

Morphological characteristics of secretory neurons of the nuclei of the hypothalamus under the influence of dark deprivation in female rats

Larisa I. Kondakova

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Abstract. In an experiment on 4-month-old mongrel female rats, the effect of 30-day dark deprivation (light-dark mode 24/0 h, artificial illumination 300 Lux) on the suprachiasmatic and arcuate nuclei of the hypothalamus was studied. The study showed that with constant artificial lighting for 30 days, the morphometric parameters of the SCN of hypothalamus decrease: the area and volume of the SCN pericaryon by 8.6 % ($p < 0.001$) and 4.6 % ($p < 0.001$); the area and volume of the nucleus by 7.6 % ($p < 0.05$) and 11.6 %. A decrease in the size of the AN was revealed: the area and volume of the pericaryon by 41.3 % ($p < 0.001$) and 56.8 % ($p < 0.001$); the area and volume of the core increased by 42.7 % ($p < 0.001$) and 54.4 % ($p < 0.001$). The morphometric characteristics of SCN and AN were almost completely restored to the values of the control group within 14 days after the cancellation of dark deprivation, which reflects the processes of reversible damage to neurons due to the implementation of compensatory adaptive mechanisms.

Keywords: premature aging, dark deprivation, hypothalamus, suprachiasmatic nucleus, arcuate nucleus

Гипоталамус играет ключевую роль в регуляции различных функций организма, таких как эндокринная деятельность, автономная и соматическая нервная системы. Этот участок мозга также отвечает за контроль ритмов и может быть вовлечен в процессы старения [1]. Некоторые гипоталамические ядра, включая супрахиазматическое (СХЯ) ядро, могут быть связаны с реализацией программы старения. В настоящее время имеется достаточное количество данных, подтверждающих роль СХЯ гипоталамуса в координации циркадных ритмов [2, 3]. Негативные воздействия на СХЯ приводят к нарушению ритмических функций, даже в условиях «свет – темнота» [4, 5, 6]. В СХЯ содержатся клетки, содержащие гонадолиберин. Сохранение циклических процессов в организме обеспечивается способностью

СХЯ передавать информацию ядрам-мишеням гипоталамуса [7, 8], одним из которых является аркуатное ядро (АЯ) гипоталамуса, что приводит к синхронизации гормональной и вегетативной систем. Аркуатное ядро, расположенное в медиобазальных отделах гипоталамуса, содержит киспетитиновые нейроны, важные для репродукции. Нейроны АЯ играют ключевую роль в генерировании пульсирующего высвобождения ГнРГ [9, 10, 11, 12], что в свою очередь способствует секреции фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) гонадотропоцитами аденогипофиза [13], способствует гаметогенезу и выработке половых гормонов. СХЯ и АЯ гипоталамуса продолжают быть объектом исследований для понимания факторов, оказывающих влияние на женскую репродуктивную систему.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определить изменение морфометрических показателей СХЯ и АЯ гипоталамуса самок белых крыс при воздействии темновой депривации.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Крысы-самки содержались в виварии лаборатории токсикологии НЦИЛС ВолгГМУ с контролируемой температурой и влажностью в соответствии с правилами лабораторной практики РФ (ГОСТ 33044-2014) и с соблюдением требований Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010. Животные имели свободный доступ к пище и воде. Проводимое исследование одобрено локальным этическим комитетом Волгоградского государственного медицинского университета (протокол от 25.11.2022 № 2022/164).

Исследование выполнено на 4-месячных половозрелых самках крыс. После 2-недельного карантина лабораторных животных рандомно разделили на 2 группы: контрольная ($n = 12$) (группа 1) и опытная ($n = 24$) (группа 2 и группа 3). Первая группа содержалась при искусственном освещении (12 свет/12 темнота, 300 Люкс) в течение 30 сут. Вторая и третья группы были помещены в условиях постоянного искусственного освещения (24/0, 300 Люкс) в течение 30 сут. Животные третьей группы 31–45-е сут. находились в условиях искусственного освещения (12 свет/12 темнота, 300 Люкс).

После проведения эксперимента животные первой и второй групп были вскрыты на 31-е сут. эксперимента, а животные третьей группы – на 45-е сут. эксперимента путем декапитации (гильотина, ООО «Открытая наука», Москва, Россия) под хлоралгидратным наркозом (400 мг/кг в воде очищенной в объеме 10 мл/кг, внутривенно) [14]. После вскрытия черепной коробки головной мозг фиксировали в 10%-м забуференном нейтральном растворе формальдегида с дальнейшим проведением автоматизированной гистологической проводки (Leica TP1020). Срезы толщиной 6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и толуидиновым синим по методу Ниссля [8]. Исследование микропрепаратов проводилось с помощью микроскопа Leica DM 1000 (Leica Microsystems GmbH, Германия). Морфометрия СХЯ и АЯ гипоталамуса проводилась с помощью программного комплекса LAS v.4.7. Определялись площадь и объем перикарионов, ядер и ядрышек СХЯ и АЯ гипоталамуса. Функциональную активность СХЯ и АЯ гипоталамуса оценивали по количественному анализу морфометрических параметров ядер нейроцитов, которые коррелируют с интенсивностью транскрипции и могут служить инструментом оценки их функционального состояния [15, 16].

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов программ GraphPad Prism 8.0. Различия между группами оценивали с помощью рангового однофакторного дисперсионного анализа

Краскела – Уоллиса с апостериорным критерием Данна и считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

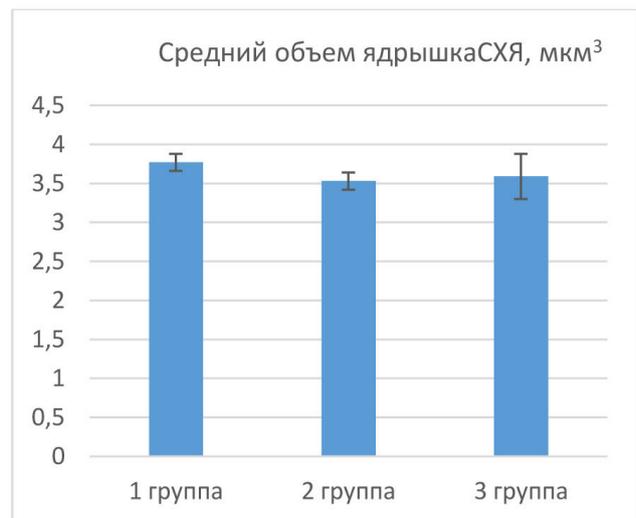
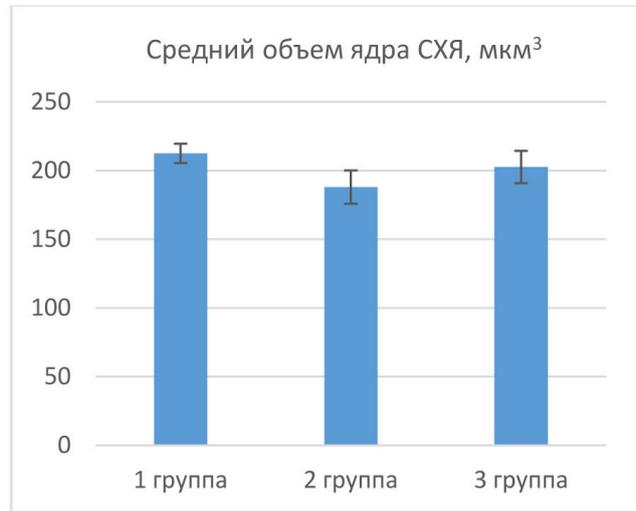
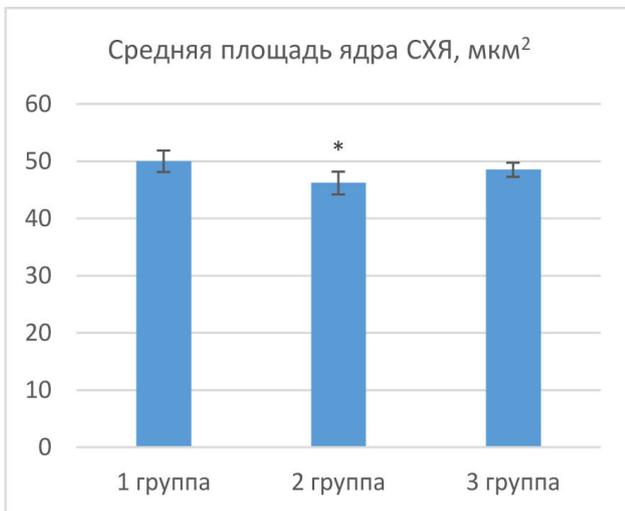
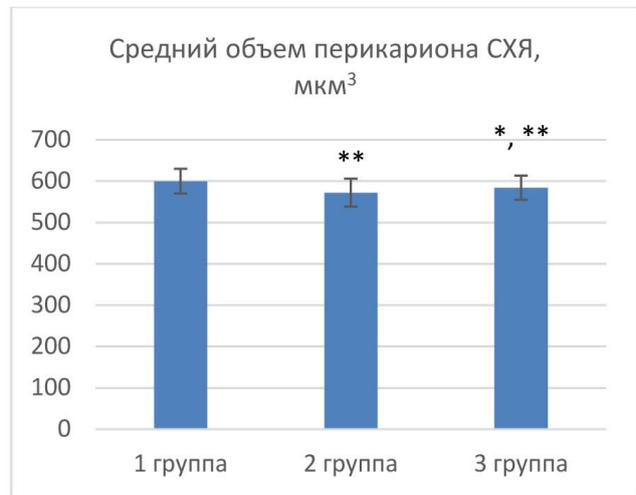
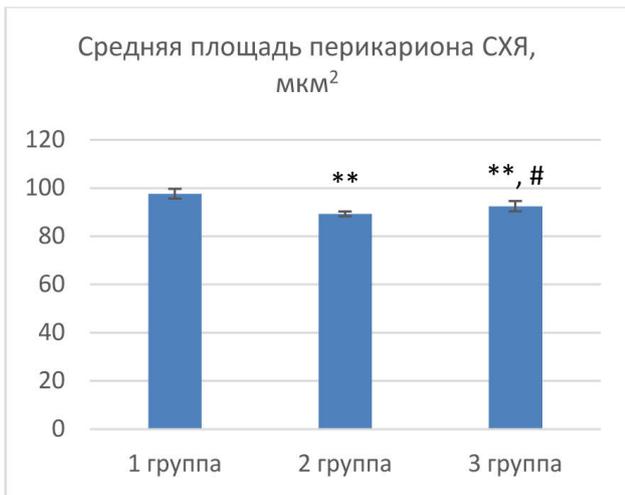
При изучении морфологических особенностей СХЯ гипоталамуса самок крыс контрольной группы выявлено, что все нейроны имели многоугольную форму с округлым или овальным темноокрашенным ядром, занимающим значительную часть перикариона, цитоплазма умеренно базофильная. Ядрышко располагалось центрально и периферически. Средняя площадь перикариона составила $(97,56 \pm 2,01)$ мкм², ядра – $(50,01 \pm 1,87)$ мкм², ядрышка – $(3,23 \pm 0,08)$ мкм². Средний объем перикариона составил $(599,43 \pm 29,94)$ мкм³, ядра – $(212,5 \pm 7,03)$ мкм³, ядрышка – $(3,77 \pm 0,11)$ мкм³.

По результатам эксперимента световой десинхронизации в виде круглосуточной темновой депривации на протяжении 30 сут. привел к статистически значимому незначительному уменьшению средней площади и объема перикарионов СХЯ на 8,6 % ($p < 0,001$) и 4,6 % ($p < 0,001$) соответственно. Также отмечено статистически достоверное снижение площади и объема ядра на 7,6 % ($p < 0,05$) и 11,6 %. Выявлено уменьшение морфометрических параметров ядрышек СХЯ: площади и объема на 9,9 и 5,8 % соответственно (рис. 1), однако эти изменения не были статистически достоверными.

Через 14 дней после отмены постоянного освещения наблюдалось частичное восстановление размеров СХЯ: увеличение площади и объема перикарионов нейронов СХЯ на 3,6 и 2,1 % соответственно. Также отмечалось увеличение площади и объема ядра на 5,0 и 7,8 % соответственно, а также увеличение площади и объема ядрышек СХЯ на 5,8 и 1,7 %.

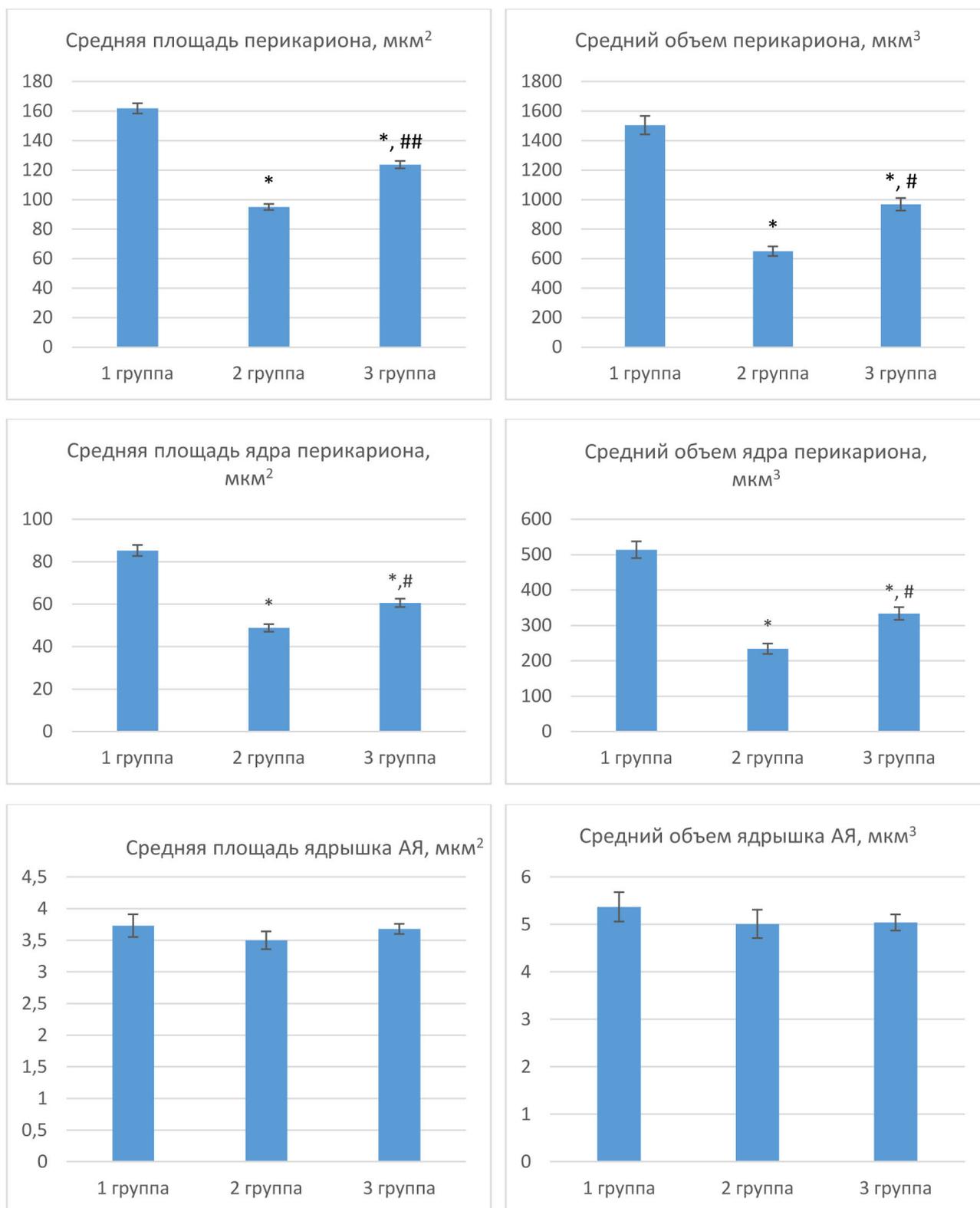
Исследование АЯ гипоталамуса самок крыс контрольной группы показало, что нейроны имели неправильную звездчатую форму с центрально расположенными ядрами, цитоплазма умеренно базофильная. Ядрышко располагалось центрально и периферически. Средняя площадь перикариона составила $(161,8 \pm 3,48)$ мкм², ядра – $(85,21 \pm 2,57)$ мкм², ядрышка – $(3,73 \pm 0,18)$ мкм². Средний объем перикариона составил $(1504,0 \pm 62,82)$ мкм³, ядра – $(513,5 \pm 23,49)$ мкм³, ядрышка – $(5,37 \pm 0,31)$ мкм³.

В АЯ гипоталамуса после 30-суточной темновой депривации выявлены значительные изменения морфометрических параметров. Постоянное освещение вызвало уменьшение средней площади и объемов перикарионов на 41,3 % ($p < 0,001$) и 56,8 % ($p < 0,001$) соответственно. Уменьшилась площадь и объем ядер АЯ на 42,7 % ($p < 0,001$) и 54,4 % ($p < 0,001$). Изменения морфометрических размеров ядрышек АЯ сопровождалось снижением площади и объема ядрышек на 9,9 и 11,6 %. Морфометрический анализ ядрышек показал отсутствие статистически достоверных различий у самок крыс в рассматриваемых экспериментальных условиях (рис. 2).



* $p < 0,05$ по отношению к показателю животных группы 1; ** $p < 0,001$ по отношению к показателю животных группы 1; # $p < 0,001$ по отношению к показателю животных группы 2 (ранговый однофакторный анализ Краскела – Уоллиса, критерий Данна).

Рис. 1. Морфометрические параметры СХЯ самок крыс с ускоренным старением, вызванным 30-дневной темновой депривацией (свето-темновой цикл 24/0 ч), $M \pm t$



* $p < 0,001$ по отношению к показателю животных группы 1; # $p < 0,05$ по отношению к показателю животных группы 2;
$p < 0,001$ по отношению к показателю животных группы 2 (ранговый однофакторный анализ Краскела – Уоллиса, критерий Данна).

Рис. 2. Морфометрические параметры АЯ самок-крыс с ускоренным старением, вызванным 30-дневной темновой депривацией (свето-темновой цикл 24/0 ч), $M \pm t$

Через 14 дней после отмены постоянного освещения наблюдалось частичное восстановление размеров АЯ ядра: увеличение на 30,2 % ($p < 0,001$) площади и на 48,9 % ($p < 0,05$) объема перикарионов нейронов АЯ. Также отмечалось увеличение площади и объема ядра АЯ на 24,1 % ($p < 0,05$) и 42,5 % ($p < 0,05$), увеличение площади и объема ядрышка АЯ на 5,8 и 7,8 %.

Длительное непрерывное воздействие света вызывает изменения в АЯ и СХЯ гипоталамуса, характеризующиеся гипотрофией, снижение их объема, сопровождающееся уменьшением размера ядра [17], что в долгосрочной перспективе может повлиять на функциональную и синтетическую активность нейроцитов и репродуктивную функцию.

Отмена темновой депривации приводит к частичному восстановлению морфометрических показателей нейронов СХЯ и АЯ гипоталамуса, а также к повышению функциональной и синтетической активности этих нейронов, что свидетельствует о восстановлении циркадных ритмов и доминировании светового режима в регуляции гипоталамуса.

Эти результаты подчеркивают важность поддержания стабильных условий освещенности для сохранения нормальной функции нейронов гипоталамуса и предотвращения возможных изменений, а также подчеркивают роль светового режима в обеспечении нормального физиологического состояния организма. Дальнейшие исследования в этом направлении могут помочь более полно раскрыть механизмы регуляции гормонального баланса и поведенческих аспектов у животных и, возможно, у людей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Постоянное круглосуточное освещение в течение 30 сут. приводит к уменьшению морфометрических параметров СХЯ и АЯ гипоталамуса самок крыс, что свидетельствует о снижении их синтетической активности. Отмена темновой депривации на 14 сут. сопровождается восстановлением параметров СХЯ и АЯ до значений, характерных для контрольных животных. Выявленные в ходе эксперимента морфологические изменения СХЯ и АЯ гипоталамуса отражают развитие процессов обратимого повреждения нейронов за счет реализации компенсаторно-приспособительных механизмов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Маслюков П.М., Ноздрачев А.Д. Гипоталамические механизмы регуляции старения. *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2021;57(3):224–239. doi: 10.31857/S0044452921030074.
2. Hastings M.H., Maywood E.S. and Brancaccio M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Reviews Neuroscience*. 2018;19(8):453–469.
3. Xu P., Berto S., Kulkarni A., Jeong B., Joseph C., Cox K.H. et al. NPAS4 regulates the transcriptional response of the

suprachiasmatic nucleus to light and circadian behavior. *Neuron*. 2021;109(20):3268–3282. doi: 10.1016/j.neuron.2021.07.026.

4. Perreau-Lenz S., Kalsbeek A., Garidou M.L., Wortel J., van der Vliet J., van Heijningen C. et al. Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *European Journal of Neuroscience*. 2003;17(2):221–228. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02442.x.

5. Ruiter M., La Fleur S.E., van Heijningen C., van der Vliet J., Kalsbeek A., Buijs R.M. The daily rhythm in plasma glucagon concentrations in the rat is modulated by the biological clock and by feeding behavior. *Diabetes*. 2003;52(7):1709–1715.

6. Silver R., LeSauter J., Tresco P.A., Lehman M.N. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature*. 1996;382(6594):810–813.

7. Buijs R.M., Scheer F.A., Kreier F., Yi Ch., Bos N., Goncharuk V.D. et al. Organization of circadian functions: interaction with the body. *Progress in brain research*. 2006;153:341–360.

8. Guo H., Brewer J.M., Champhekar A., Harris R.B., Bittman E.L. Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*. 2005;102(8):3111–3116.

9. Dulka E., Moenter S. SAT-412 Effects of the Ovary and Dihydrotestosterone on Firing Rate of GnRH Neurons in Prenatally Androgenized Mice. *Journal of the Endocrine Society 3 (Suppl. 1)*. 2019;3. doi: 10.1210/js.2019-SAT-412.

10. Herbison A.E. The gonadotropin-releasing hormone pulse generator. *Endocrinology*. 2018;159(11):3723–3736.

11. Padilla S.L., Perez J.G., Ben-Hamo M., Johnson C.W., Sanchez R.E.A., Bussi I.L. et al. Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus Orchestrate Circadian Rhythms and Metabolism. *Current biology*. 2019;29(4):592–604.e4. doi: 10.1016/j.cub.2019.01.022.

12. McQuillan H.J., Han S.Y., Cheong I., Herbison A.E. GnRH Pulse Generator Activity Across the Estrous Cycle of Female Mice. *Endocrinology*. 2019;160(6):1480–1491. doi:10.1210/en.2019-00193.

13. Gottsch M.L., Clifton D.K., Steiner R.A. Kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis. *Molecular and cellular endocrinology*. 2006;254–255:91–96. doi: 10.1016/j.mce.2006.04.030.

14. Кондакова Л.И., Багметова В.В., Сиротенко В.С., Доника А.Д. Влияние мелатонина на динамику массы тела и уровень белка Клото в крови у животных с преждевременным старением, вызванным темновой депривацией. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2022;19(4):110–117. doi: 10.19163/1994-9480-2022-19-4-110-117.

15. Ажикова А.К., Сомотруева М.А., Смирнов А.В., Замелов А.А. Морфофункциональное состояние аркуатного ядра гипоталамуса крыс в динамике ожоговой травмы. *Морфологические ведомости*. 2020;28(2):9–17. doi: 10.20340/mv-mn.2020.28(2):9-17.

16. Муратова Н.Р., Котельникова С.В. Функциональное состояние аркуатного ядра гипоталамуса в динамике токсического стресса, вызванного солью кадмия. *Современные проблемы науки и образования*. 2014;6.

17. Котельникова С.В., Котельников А.В., Зайцев В.Ф. Влияние токсического стресса на морфофункциональное состояние аркуатного ядра гипоталамуса в условиях измененного режима освещенности. *Юг России: экология, развитие*. 2016;2:185–191.

REFERENCES

1. Masliukova P. M., Nozdrachev A. D. Hypothalamic mechanisms of the regulation of aging. *Zhurnal evolyutsionnoi biokhimii i fiziologii = Journal of evolutionary biochemistry and physiology*. 2021;57(3):224–239. (In Russ.) doi: 10.31857/S0044452921030074.

2. Hastings M.H., Maywood E.S. and Brancaccio M. Generation of circadian rhythms in the suprachiasmatic nucleus. *Nature Reviews Neuroscience*. 2018;19(8):453–469.

3. Xu P., Berto S., Kulkarni A., Jeong B., Joseph C., Cox K.H. et al. NPAS4 regulates the transcriptional response of the suprachiasmatic nucleus to light and circadian behavior. *Neuron*. 2021;109(20):3268–3282. doi: 10.1016/j.neuron.2021.07.026.

4. Perreau-Lenz S., Kalsbeek A., Garidou M.L., Wortel J., van der Vliet J., van Heijningen C. et al. Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *European Journal of Neuroscience*. 2003;17(2):221–228. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02442.x.

5. Ruiter M., La Fleur S.E., van Heijningen C., van der Vliet J., Kalsbeek A., Buijs R.M. The daily rhythm in plasma glucagon concentrations in the rat is modulated by the biological clock and by feeding behavior. *Diabetes*. 2003;52(7):1709–1715.

6. Silver R., LeSauter J., Tresco P.A., Lehman M.N. A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms. *Nature*. 1996;382(6594):810–813.

7. Buijs R.M., Scheer F.A., Kreier F., Yi Ch., Bos N., Goncharuk V.D. et al. Organization of circadian functions: interaction with the body. *Progress in brain research*. 2006;153:341–360.

8. Guo H., Brewer J.M., Champhekar A., Harris R.B., Bittman E.L. Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*. 2005;102(8):3111–3116.

9. Dulka E., Moenter S. SAT-412 Effects of the Ovary and Dihydrotestosterone on Firing Rate of GnRH Neurons in Prenatally Androgenized Mice. *Journal of the Endocrine Society 3 (Suppl.)*. 2019;3. doi: 10.1210/js.2019-SAT-412.

10. Herbison A.E. The gonadotropin-releasing hormone pulse generator. *Endocrinology*. 2018;159(11):3723–3736.

11. Padilla S.L., Perez J.G., Ben-Hamo M., Johnson C.W., Sanchez R.E.A., Bussi I.L. et al. Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus Orchestrate Circadian Rhythms and Metabolism. *Current biology*. 2019;29(4):592–604.e4. doi: 10.1016/j.cub.2019.01.022.

12. McQuillan H.J., Han S.Y., Cheong I., Herbison A.E. GnRH Pulse Generator Activity Across the Estrous Cycle of Female Mice. *Endocrinology*. 2019;160(6):1480–1491. doi:10.1210/en.2019-00193.

13. Gottsch M.L., Clifton D.K., Steiner R.A. Kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis. *Molecular and cellular endocrinology*. 2006;254–255:91–96. doi: 10.1016/j.mce.2006.04.030.

14. Kondakova L.I., Bagmetova V.V., Sirotenko V.S., Donika A.D. The effect of melatonin on the dynamics of body weight and the level of Klotho protein in the blood of animals with premature aging caused by dark deprivation. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Journal of Volgograd State Medical University*. 2022;19(4):110–117. (In Russ.) doi: 10.19163/1994-9480-2022-19-4-110-117.

15. Azhikova A.K., Samotrueva M.A., Smirnov A.V., Zamlelov A.A. the morphological and functional state of the arcuate nucleus of the hypothalamus of rats in burn injury dynamics. *Morfologicheskie vedomosti = Morphological newsletter*. 2020;28(2):9–17. (In Russ.) doi: 10.20340/mv-mn.2020.28(2):9-17.

16. Muratova N.R., Kotelnikova S.V. The functional condition of the arcuate nucleus of the hypothalamus in the dynamics of toxic stress caused by cadmium salt. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern problems of science and education*. 2014;6. (In Russ.).

17. Kotelnikova S.V., Kotelnikov A.V., Zaitsev V.F. The impact of toxic stress on the morphofunctional state of the hypothalamic arcuate nucleus in the conditions of the changed mode of light exposure. *Yug Rossii: ekologiya, razvitie = South of Russia: Ecology, Development*. 2016;2:185–191. (In Russ.).

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Информация об авторе

Л.И. Кондакова – кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; larisakondakova@gmail.com;

Статья поступила в редакцию 04.03.2025; одобрена после рецензирования 16.05.2025; принята к публикации 19.05.2025.

Competing interests. The author declares that they have no competing interests.

Information about the author

L.I. Kondakova – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Histology, Embryology, Cytology, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; larisakondakova@gmail.com

The article was submitted 04.03.2025; approved after reviewing 16.05.2025; accepted for publication 19.05.2025.